

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Ermo Leuska

rRNA modifikatsioonid ühendatud subühikutega ribosoomides *E. coli* rakkudes

Bakalaureusetöö

geenitehnoloogia

12 EAP

Juhendaja:
PhD Margus Leppik

TARTU 2016

SISUKORD

| | |
|---|----|
| INFOLEHT | 3 |
| KASUTATUD LÜHENDID | 4 |
| SISSEJUHATUS | 5 |
| KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 6 |
| 1 Ribosoomi üldine iseloomustus | 6 |
| 1.1 Ribosoomaalne RNA (rRNA) | 8 |
| 1.2 Ribosoomide biogenees prokarüootides | 11 |
| 1.2.1 rRNA transkriptsioon | 11 |
| 1.2.2 rRNA protsessing | 12 |
| 1.2.3 rRNA modifikatsioonid | 12 |
| 1.3 Valgusüntees | 15 |
| 2. EKSPERIMENTAALNE OSA | 17 |
| 1 Töö eesmärk..... | 17 |
| 2 Materjal ja meetodika..... | 18 |
| 2.1 Plasmiidid ja <i>E. coli</i> tüved..... | 18 |
| 2.2 Söötmed..... | 19 |
| 2.3 Puhvrid, ensüümid ja reagensid..... | 19 |
| 2.4 Ribosoomipartiklite lahutamine ja kogumine..... | 19 |
| 2.5 Ribosoomaalse RNA puhastamine ja analüüs | 21 |
| 3 Tulemused ja arutelu | 22 |
| 3.1 Ribosoomopartiklite lahutamine sahharoosigradiendis | 22 |
| 3.2 rRNA eraldamine fenool-kloroformtöötlustega ja tulemuste kontroll agarosgeelil .. | 23 |
| 3.3 Modifitseeritud nukleosiidide detekteerimine RP-HPLC analüüsil..... | 24 |
| KOKKUVÕTE | 30 |
| SUMMARY | 31 |
| TÄNUSÕNAD | 32 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 33 |
| Artiklid: | 33 |
| Raamatud: | 36 |
| LISAD | 37 |
| Lisa 1 | 37 |
| Lisa 2 | 38 |
| LIHTLITSENTS | 39 |

rRNA modifikatsioonid ühendatud subühikutega ribosoomides *E. coli* rakkudes

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas Ribo-T ribosoomides esineb samas proportsioonis rRNA modifikatsioone kui kontrollribosoomides.

Modifikatsioonimuster Ribo-T ribosoomides erineb kontrolltüvest, kusjuures vähenenud on modifikatsioonid, mis on varasemalt kirjanduses näidatud esinevat ribosoomi biogeneesi hilises osas eraldatud partiklites kui ka 16S rRNA piirkonnas, millesse tehti muudatused, kui loodi seotud ribosoomi rRNA konstrukt.

Modifikatsioonide puudumine võib olla põhjustatud sellest, et niimoodi kokku pandud rRNA, ei oma korrektset äratundmissaiti, mida tunneks ära modifikatsiooni eest vastutav ensüüm.

Märksõnad: rRNA, modifikatsioonid, ribosoom, translatsioon

CERCS kood: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

rRNA modifications in ribosomes with tethered subunits in *Escherichia coli* cells

The aim of this thesis was to analyze the rRNA modification pattern in ribosomes with tethered subunits compared to the control ribosomes. The experimenter analyzed three different *E. coli* strains, one control strain and two strains with Ribo-T ribosomes exhibiting slightly different regeneration times.

Different ribosomal patterns in ultracentrifugation gradients, gel-electrophoresis and RP-HPLC analysis revealed that the modification pattern in Ribo-T ribosomes compared to control ribosomes were different. The missing modification were either located near Ribo-T linker area or these modifications were known to be late in ribosome biogenesis. That information shows that the modification enzymes, that carry out these modifications can't access their substrates due to the different conformation of rRNA.

Keywords: rRNA, modifications, ribosome, translation

CERCS code: P320 Nucleic acids, protein synthesis

KASUTATUD LÜHENDID

Å – ångström, pikkusühik, 10^{-10} m ehk 0,1 nm

Amp – ampitsilliin

Brij 58 – polüetüleenglükoolheksadeküüleeter

DNA – desoksüribonukleiinhape

LLP – lüüsilahjenduspuhver

LP – lüüsipuhver

ME – modifitseeriv ensüüm

MN – modifitseeritud nukleosiid

mRNA – *messenger* RNA

nt – nukleotiid

PTC – peptidüültransferaasne tsester

Ribo-T – *tethered ribosomes*, ribosoomid, mille subühikud ei lähe kunagi lõplikult lahku

RP-HPLC – *reverse phase high-performance liquid chromatography*

rRNA – ribosomaalne RNA

S – Svedbergi ühik

tRNA – transport RNA

U – *unit*

wt – wild-type

β-ME – 2-merkaptotetanool

Ψ – pseudouridiin

SISSEJUHATUS

Ribosoom on ribonukleoproteiinkompleks, mis vastutab rakus valgusünteesi eest. Ribosoom loeb mRNA nukloetiidse järjestuse pealt informatsiooni, et luua valkude aminohappeline järjestus, kasutades koodon-antikoodon äratundmist. Kõikides eluslooduse domeenides on ribosoomi ehituses kaks erineva suurusega subühikut, mis assambleeruvad iseseisvalt, kuid assotsieeruvad valgusünteesi initsiatsioonil koordineeritult üheks kompleksiks ja dissotsieeruvad pärast valgusünteesi terminatsiooni uuesti kaheks eraldiseisvaks subühikuks. Nii suur kui väike subühik assambleeruvad ribosomaalse RNA (rRNA) sekundaarstruktuuriga seonduvate ribosomaalsete valkude (r-valkude) liitumisel, tekitades kõrgemat järku struktuure.

Escherichia coli on enamlevinud mudelorganism ribosoomi uurimisel. *E. coli* ribosoomis on kolm erineva suurusega rRNA molekuli (16S, 23S ja 5S rRNA) ning 54 r-valku. Kui r-valgud on eelkõige ribosoomis struktuuri toetava funktsiooniga, siis rRNA omab nii mRNA nukloetiidsest järjestusest geneetilise info äratundmise võimekust, kui ka peptiidsideme sünteesi katalüüsivõimet, seega on ribosoom oma olemuselt ribosüüm.

Ribosoomi mõlema subühiku rRNA sisaldab modifitseeritud nukleosiide, mis on fülogeneetiliselt konverveerunud ja millede tähtsus ribosoomi funktsioneerimises on paljuski veel ebaselge. rRNA modifikatsioone viivad prokarüootis läbi igale modifikatsioonile vastavad modifikatsioonensüümid, mis peavad enamasti tegutsema ribosoomi subühikute biogeneesi kulgemisega koordineeritult, sest vastasel juhul ei pruugi rRNA olla enam vajalikust piirkonnast kättesaadav või on rRNA konformatsioon ebasobiv modifikatsioonireaktsiooni läbi viimiseks.

Hiljuti on ühe töögrupi poolt konstrueeritud esmakordselt selline ribosoom, mille subühikud on omavahel alaliselt seotud, kuid mis on võimelised läbima ribosoomi biogeneesi, saades funktsioneerivateks ribosoomideks ning tagades piisavalt efektiivse valgusünteesi raku ellujäämiseks, kuigi oluliselt pikenenenud rakkude jagunemisjaga.

Käesoleva töö kirjanduslikus osas antakse lühiülevaade ribosoomi komponentidest, struktuurist, biogeneesist ja funktsioonist. Töö eksperimentaalses osas analüüsitakse alaliselt koos püsivate ribosoomide rRNA modifikatsioonide hulka võrreldes kontrolltüvega, millel on normaalsed kahest eraldiseisvast erineva suurusega subühikust koosnevad ribosoomid, mis valgusünteesi initsiatsioonil assotsieeruvad ja valgusünteesi terminatsioonil dissotsieeruvad.

Märksõnad: rRNA, modifikatsioonid, ribosoom, translatsioon.

1 Ribosoomi üldine iseloomustus

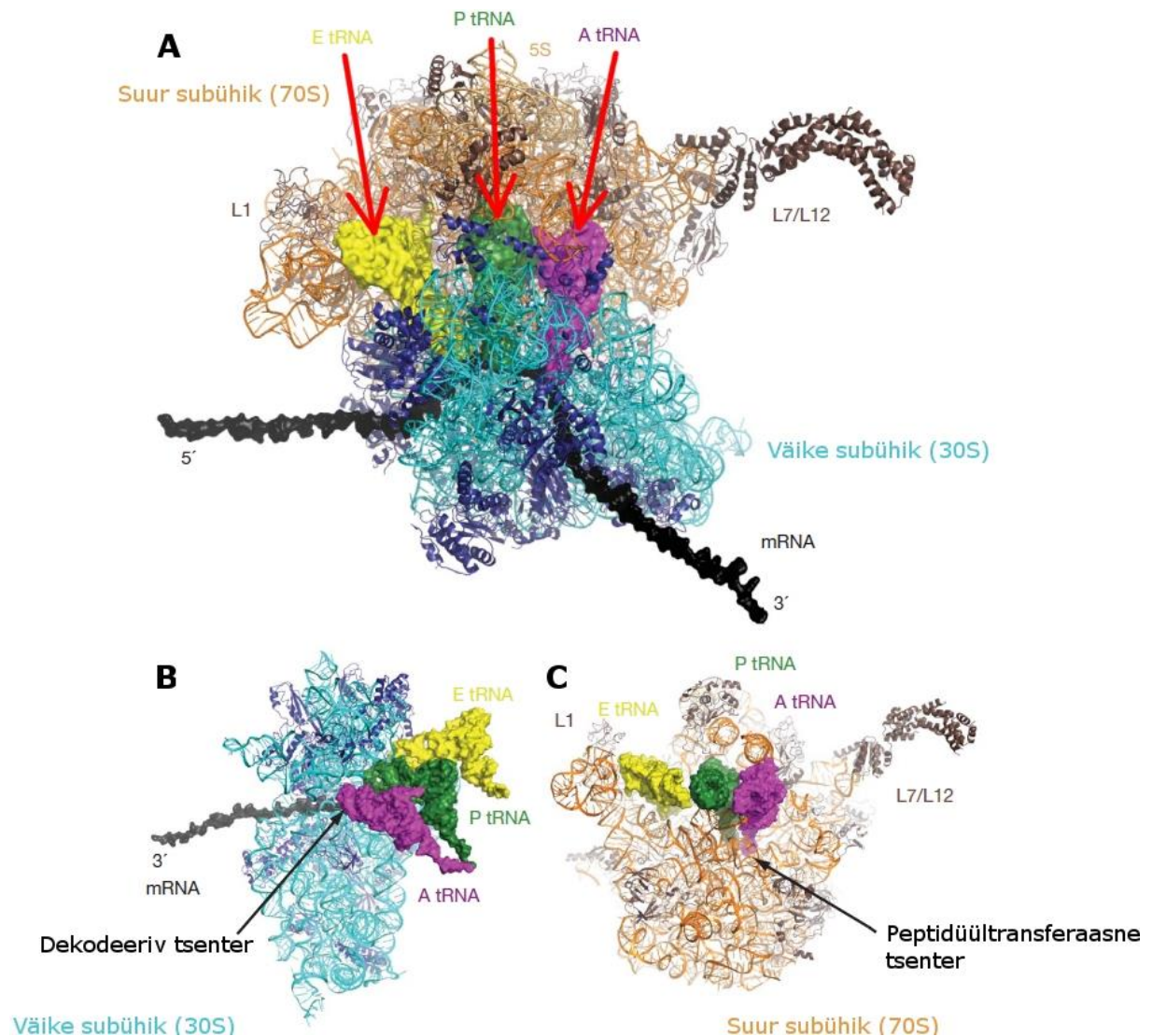
Ribosoom on makromolekulaarne ribonukleoproteiinkompleks, mis vastutab genoomis säilitatud geneetilise info tõlkimise eest valkude aminohappeliseks järjestuseks. Kõikides eluslooduse domeenides on ribosoomide põhistruktuur ja -funktsioon konserveerunud, kuigi eukarüootide ribosoom on struktuuriliselt keerukam kui eubakterite ja arhede ribosoomid. Oma olemuselt on ribosoom ribosüüm ja ribonukleiinhappe (RNA) baasil tehtud polümeraas (Rodnina et al., 2006). Kõik ribosoomid koosnevad kahest erineva suurusega subühikust, mis sisaldavad ribosomaalset RNA-d (rRNA) ja ribosoomaalseid valke (r-valgud). rRNA osaleb geneetilise info dekodeerimises *messenger* RNA (mRNA) nukleotiidses järjestuses põhjal ja r-valgud mängivad tugirooli ning osalevad ribosoomi biogeneesis korrektses rRNA konformatsiooni tekitamisel ning hoidmisel (Ben-Shem et al., 2011).

Kõige rohkem uuritud prokarüootne mudelorganism on *Escherichia coli* (*E. coli*), mis on samuti põhiliseks mudelorganismiks ribosoomiuuringutes. Bakteri ribosoomi molekulmass on umbes 2,5 megadaltonit ja diameeter umbes 210 Å (Wilson et al., 2002; Wilson & Nierhaus, 2003). Prokarüootne ribosoom sedimenteerub 70S partiklina ning on moodustunud kahest erineva suurusega subühikust, mis sedimenteeruvad vastavalt 50S (suur subühik) ja 30S (väike subühik) partiklitenä (Tissieres & Watson, 1958) (joonis 1). S on Swedbergi ühik, mis on ära määratud sedimenterumise kiirusena gradiendis tsentrifugaaljõu toimel.

Bakteri ribosoom koosneb umbes kahest kolmandikust RNast ja ühest kolmandikust valkudest (Schluenzen et al., 2000, Yusupov et al., 2001). *E. coli* ribosoomi väike subühik sisaldab ühte rRNA molekuli, mis sedimenteerub kui 16S rRNA (1542 nukleotiidi (nt)) ja 21 r-valgust (S1-S21). *E. coli* suur subühik koosneb kahest rRNA molekulist, 23S (2904 nt) ja 5S (120 nt) ning 33-st L-valgust (L1-L36) (Wilson & Nierhaus, 2007). *E. coli* ribosoomis esineb iga ribosoomi komponent ühe kordusena, välja arvatud kaks koopiat L12 valku ja kaks koopiat L12 valgu N-terminaalselt atsetüleeritud derivaati, mida teatakse ribosoomi valgu L7-na. (Hardy, 1975; Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007).

Ribosomaalsete valkude (r-valgud) primaarne funktsioon tundub olevat rRNA struktuuri stabiliseerimine, sest enamus r-valke asetsevad subühikute pinnal ja on struktuurilt globulaarsed või sisaldavad väljaulatavaid osi, mis ulatuvad subühikute sisemusse, et täita rRNA sekundaarstruktuuri elementide vahel olevaid tühimikke (Wimberly et al., 2000; Yusupov et al., 2001). Osade r-valkude esinemine on hädavajalik ribosoomide subühikute biogeneesis (kirjeldatud käesoleva töö punktis 1.2), aga on mittevajalikud täielikult assambleerunud ribosoomis (Wilson & Nierhaus, 2005). Ribosoomi kahe subühiku vaheline

kokkupuutepind on suhteliselt r-valkude vaba. Subühikute kokkupuutepind annab lisaks subühikute omavahelistele kontaktidele pinna ka mitmesugustele substraatide ja ligandide seondumisele, mis on vajalikud valgusünteesi toimumiseks, kaasa arvatud kolmele *transfer* RNA (tRNA) seondumiskohale: 1) aminoatsüül-tRNA sidumise piirkond (A-sait), peptidüül-tRNA sidumise piirkond (P-sait) ja deatsüleeritud tRNA sidumise piirkond (E-sait) (Selmer et al., 2006) (joonis 1).



Joonis 1. Bakteriaalse ribosoomi struktuur. A. 70S ribosoomi struktuur, milles on näidatud mRNA ja A-, P- ning E-saidis olevad tRNA-d. B. Ribosoomi väikese subühiku struktuur, milles on näidatud dekodeeriv tseenter. C. Ribosoomi suure subühiku struktuur, milles on näidatud peptidüültransferaasne tseenter. Joonistel on suur subühik kujutatud pruunina, väike subühik helesinisena, A, P, E saidis olevad tRNA-d vastavalt lilla, rohelse ja kollasena ning mRNA on must. (Illustratsioon adapteeritud Schmeing & Ramakrishnan, 2009).

Mõlemad ribosoomi subühikud mängivad valgusünteesis erinevat rolli. Väike subühik vastutab mRNA seondumise eest translatsiooni initsiatsioonil ja sisaldab dekodeerivat tsentrit, mis valib mRNA koodonite ja tRNA antikoodonite vaheliste interaktsioonide “jälgitamise” läbi korrektse

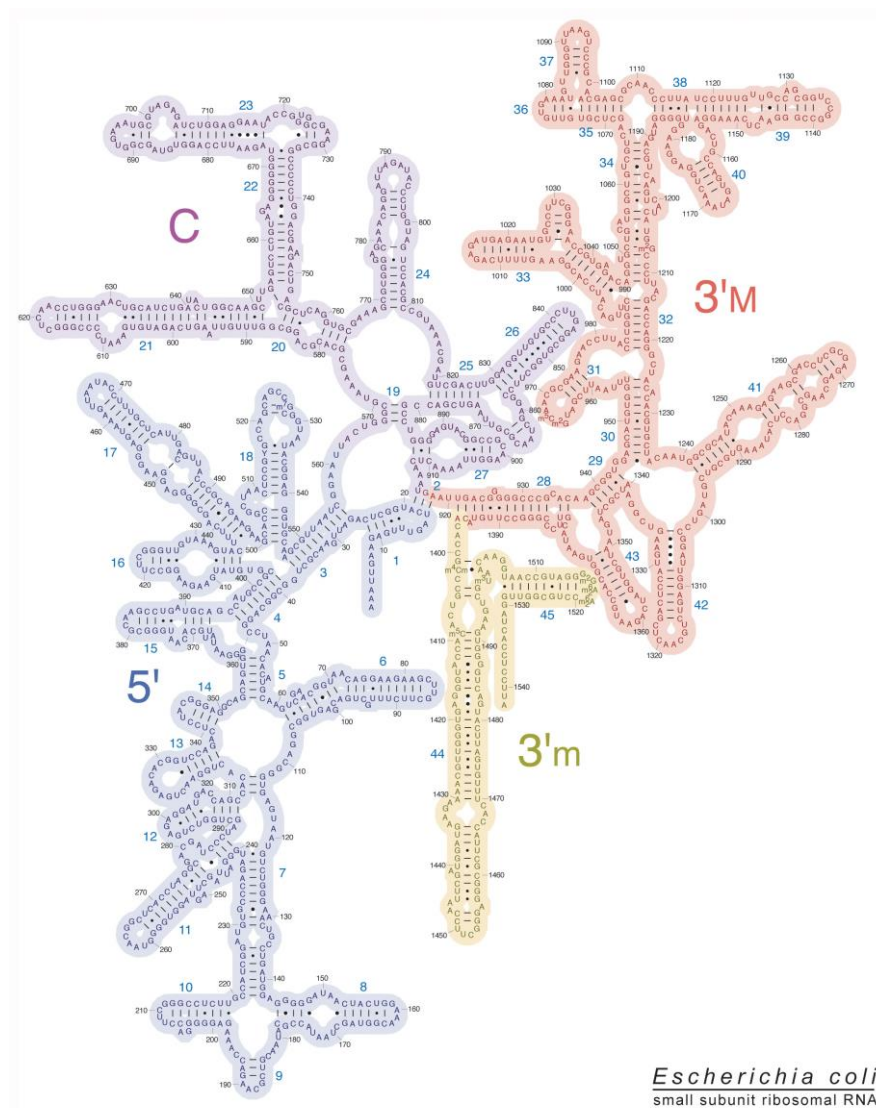
tRNA ja sellega määrab ära, milline aminohape järgmisena polüpeptiidahelasse lisatakse (Melnikov et al., 2012). Suurel subühikul asub peptidüültransferaasne tsenter (PTC), mis katalüüsib reaktsiooni ribosoomi A-saidis asuva aminoatsüül-tRNA aminohappejäägi ja P-saidis oleva peptidüül-tRNA küljes oleva vastsünteesitud valguaeha vahel. PTC katalüüsib ka vastsünteesitud peptiidi hüdrolyüsi peptidüül-tRNA küljest translatsiooni terminatsiooni käigus (Selmer et al., 2006).

Subühikute omavahelise assotsieerumise käigus tekivad subühikuid ühendavad sillad, mis on enamasti prokarüootidel rRNA-rRNA interaktsioonid, vähemal määral esineb sildu r-alkude ja rRNA vahel ning prokarüootides on kirjeldatud ainult üks alk-alk subühikute vaheline sild. Stabiilse iseloomuga RNA-RNA sillad asuvad enamasti ribosoomi keskmes ja RNA-alk ja alk-alk interaktsioonid pigem perifeerias ning need on alimad katkema, translatsiooni ajal, ribosoomi konformatsiooniliste muutuste käigus (Yusupov et al., 2001). Kolmemõõtmelise krüo-elektronmikroskoopia andmed kirjeldavad dünaamilisi muutusi kahes erinevas funktsionaalses seisundis oleva *E. Coli* 70S ribosoomi struktuuris, mida seletatakse translatsiooni ajal toimuva subühikute üksteise suhtes liikumisega (*ratchet* tüüpi liikumine) (Frank & Agrawal, 2000; Gao et al., 2003). Võrreldes kahte erinevat seisundit, on näha, et ribosoomi kompaktsem struktuur muutub vabama struktuuriga kompleksiks, kus muutuvad paljude r-alkude konformatsioonid. Seega leitakse, et muutujateks on need subühikute vahelised sillad, mis on moodustunud alkudest, samas RNA-RNA vahel moodustunud sillad ei muutu translatsiooni ajal, stabiliseerides 70S ribosoomi koospüsimit *ratchet* tüüpi liikumisel. (Gao et al., 2003).

Hiljuti on konstrueeritud selline ribosoom, mis sisaldab RNA-RNA lisasilda, põhjustades ribosoomi subühikute pideva koosolemise: alates biogeneesist kuni valgusünteesi terminatsioonini ei lähe suur ja väike subühik lõplikult kunagi lahku. Selline sild on paigutatud strateegiliselt sobivasse asukohta ribosoomi perifeerias, võimaldades ribosoomi biogeneesi funktsionaalseks ribosoomiks ning subühikute vahelist *ratchet* tüüpi liikumist valgusünteesil (Orelle et al., 2015).

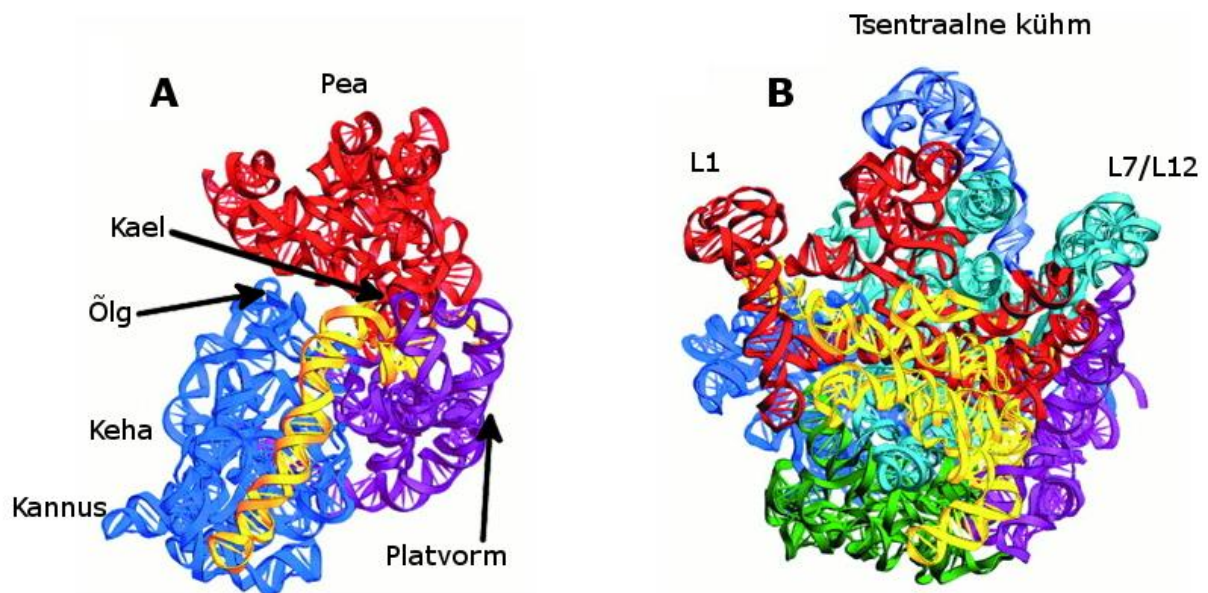
1.1 Ribosoomaalne RNA (rRNA)

Ribosomaalse RNA primaarjärjestused varieeruvad eluslooduses, kuid sekundaar- ja tertsiaarstruktuuri tasemel on kõikide organismide ribosoomid sarnased. rRNA sekundaarstruktuur moodustub biheeliksitest, mis on ühendatud üheaahelalise RNA poolt, mis moodustavad linge. (Wimberly et al., 2000) (joonised 2, 4).



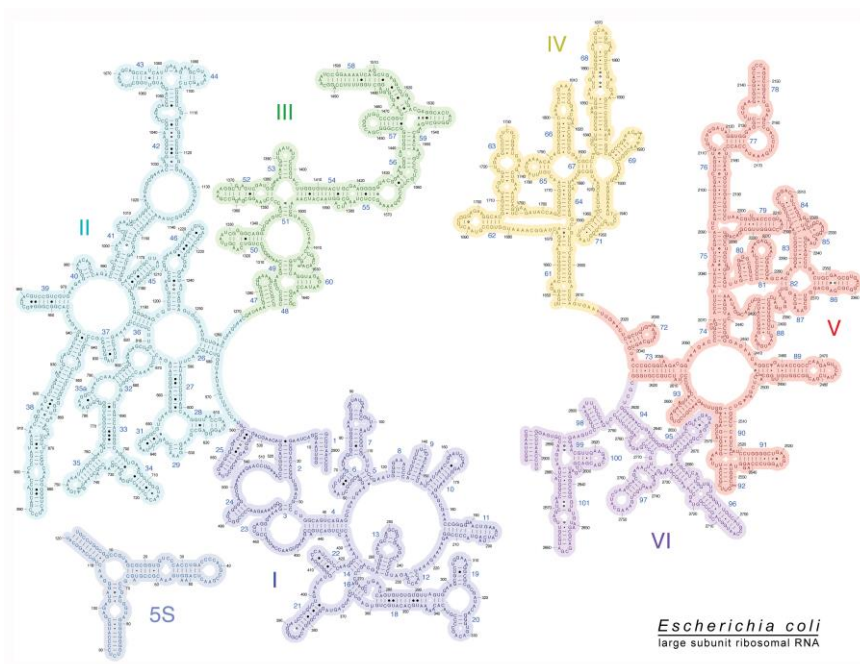
Joonis 2. *Escherichia coli* ribosoomi väikese subühiku rRNA (16S rRNA) sekundaarstruktuur. Joonisel on näidatud 16S rRNA 5' domeen sinisena, tsentraalne domeen (C) lillana, 3' mažoorne domeen (3'M) punasena ja 3' minoorne domeen (3'm kollasena) (Noller & Woese., 1981).

Ribosoomi väikese subühiku 16S rRNA saab jagada sekundaarstruktuuri alusel neljaks domeeniks: 5' domeen, tsentraalne domeen, 3' mažoorne domeen ja 3' minoorne domeen. (Wilson et al., 2002) (joonis 3). Ribosoomi tertsiaarstruktuuris kirjeldatakse väikese subühiku elemente ka antropomorfsete kujundite abil: keha, pea, õlg, kannus ja platvorm (joonis 3 A). 16S rRNA domeenid jagunevad tertsiaarstruktuuris vastavalt: 5' domeen moodustab väikese subühiku keha ja kannuse, tsentraalne domeen moodustab platvormi, 3' mažoorne moodustab subühiku pea ja 3' minoorne domeen koos heeliksiga 44 ja 45 kaela ja õla. 16S rRNA 3' otsas asub prokarüootseks translatsiooniks oluline anti-Shine-Dalgarno järjestus. Anti-Shine-Dalgarno järjestus aluspaardub, translatsiooni initsiatsiooni käigus, mRNA-del 5-7 nukleotiidi enne initsiatsioonikoodonit leitava ribosoomi seondumiskiirgusega, nn Shine-Dalgarno järjestusega, mille tagajärjel positsioneerub initsiaatorkoodon ribosoomi P-saiti. (Shine & Dalgarno, 1974; Wilson et al., 2002).



Joonis 3. rRNA-de tertsiaarstruktuurid. A. 16S rRNA kolmemõõtmeline struktuur, kus on näidatud domeenide antropomorfseid kujundid: kael, õlg, keha, kannus ja platvorm. B. 23S ja 5S rRNA kolmemõõtmeline struktuur, kus on tähistatud suure subühiku väikese subühiku poolse küljel eristatavad kolm kühmu: L1, tsentraalne ja L7/L12 kühm. (Illustratsioon adapteeritud Yusupov et al., 2001)

Ribosoomi suure subühiku 23S rRNA saab jagada sekundaarstruktuuri alusel kuueks domeeniks (I-VI) (Decatur & Fournier, 2002) (joonis 4). Suure subühiku 5S rRNA-d võib tinglikult pidada 23S rRNA seitsmendaks domeeniks. Erinevalt väikesest subühikust ei eristata suure subühiku rRNA tertsiaarstruktuuri antropomorfsete kujundite järgi, sest 23S rRNA domeenid ja 5S rRNA on üksteisega tihedalt läbipõimunud poolkerakujuliseks struktuuriks. Suurel subühikul on eristatavad kolm kühmu, mis asuvad 50S subühiku peal, kui vaadelda seda väikese subühiku poolsest küljelt: vasak kühm sisaldab r-valku L1, parem kühm r-valke L7 ja L12 ning tsentraalne kühm koosneb põhiliselt 5S rRNA-st ja sellega seotud valkudest (joonis 3 B) (Moore & Steitz, 2003).



Joonis 4. *Escherichia coli* ribosoomi suure subühiku rRNA sekundaarstruktuur. Joonisel on erinevate värvidega näidatud 23S rRNA domeenid I, II, III, IV, V, VI ja 5S rRNA (Noller et al., 1981).

1.2 Ribosoomide biogenees prokariotides

Ribosoomide biogenees on keerukas protsesside jada, kus on vajalikud kõikide rRNA komponentide transkriptsioon, ribosoomi valkude translatsioon ning erinevad protsessimise, modifitseerimise, voltumise ja assambleerumise etapid. Kõik see peab toimuma täpselt ja efektiivselt, et moodustuks funktsionaalne terviklik ribosoom (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007)

1.2.1 rRNA transkriptsioon

Ribosoomide biogenees algab rRNA geenide transkriptsiooniga, mis on organiseeritud operonidesse. rRNA operon transkribeeritakse esmase ühe transkriptina, mis sisaldab omavahel ühendatud 16S, 23S ja 5S rRNA järjestusi (pre-rRNA) (Kaczanowska & Ryden-Aulin, 2007). Selliselt konserveerunud geenide esinemine ühes operonis kindlustab võrdse hulga kõigi kolme erineva rRNA transkribeerimise. Lisaks eelpool kirjeldatud rRNA eellastele sisaldavad kõnealused operonid ühte või mitut tRNA järjestust (Kaczanowska & Ryden-Aulin, 2007).

Samal ajal kui rRNA esmast transkripti alles sünteesitakse hakkavad moodustuma rRNA sekundaarstruktuurid, mis tekitavad seondumissaite r-valkutele, mille seondumise järel tekivad kõrgemat järku struktuurid. RNA-d siduvad valgud tunnevad ära kõrgema järku struktuurseid elemente, mitte primaarjärjestust nagu enamus DNA seoselisei valke (Brodersen et al., 2002). Seondunud r-valgud stabiliseerivad rRNA-d oma seondumisaigas ning lisaks põhjustab konformatsioonilisi muutusi lähedastes rRNA regioonides, mis loob eelduse teiste r-valkude seondumiseks (Shajani et al., 2011; Woodson, 2011), seega on r-valkudel suur roll rRNA

korrektsel voltumisel. On leitud, et umbes üks kolmandik *E. coli* suure subühiku r-valkudest omavad RNA *chaperoonset* aktiivsust (Wilson & Nierhaus, 2005), mis tõenäoliselt aitavad vältida riboomide ebakorrektset voltumist.

Samas on näidatud, et erinevate rRNA-de korrapärane transkriptsioon ei ole obligatoorne, sest need konstrueeritud *E. coli* tüved, kus 16S ja 23S rRNA transkriptid on paigutatud erinevatesse geenidesse, on eluvõimelised (Kitahara & Suzuki, 2009). Tänapäevase arusaama järgi võib ribosoomide biogeneesi toimuda mitme paralleelse raja kaudu, sest erinevate meetodidega saavutatud erinevad ribosoomi biogeneesi vahepartiklid, sisaldavad erinevaid r-valke (Sykes et al., 2010), seega ei saa ribosoomi biogeneesi näol olla tegemist ainult ühe kindla ja konserveerunud biogeneesi rajaga. Lisaks rRNA geenide transkriptsioonile ja korreksele assambleerumisele sisaldab ribosoomi biogeneesi ka rRNA nukleotüütilist protsessimist ja rRNA ja r-valkude modifitseerimist Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007).

1.2.2 rRNA protsessing

rRNA protsessimine on ensümaatiliste sündmuste kogum, milles osalevad erinevad nukleasid ja mille esimeses etapis konverteeritakse rRNA prekursor (pre-rRNA) väiksemateks: väikese ja suure subühiku eellas-rRNA-deks, mida omakorda lõigatakse parajaks, saavutades nende iseloomuliku ja funktsionaalselt korrekse pikkuse. Esmases rRNA transkriptis olevad järjestused, mis külgnevad 16S ja 23S rRNAdega moodustavad pre-rRNA-s kaksikheeliksi struktuuri, mille tunneb ära ja lõikab ribonukleas III (RNAas III), veel enne kui pre-rRNA transkriptsioon on lõpule jõudnud (Bram et al., 1980). Siiski ei ole pre-rRNA RNAas III-e poolt lõikamine rakkude jaoks elutähtis protsess, sest *E. coli* tüvi, milles on RNAas III geenid deleteeritud, on ikkagi eluvõimeline, sest rRNA lõigatakse lahti teiste nukleaside poolt (Srivastava & Schlessinger, 1990). Kogu rRNA pikkuste protsessimine on mitmete restriktasid järjestikune töö, kus korrekse pikkusega rRNA molekulide saamiseks tuleb eellasmolekulide 5' ja 3' otstes olevaid lisanukleotiide eemaldada (*fine-tuning*). On teada, et 16S rRNA puhul on *fine-tuning* olulisem kui 23S rRNA ja 5S puhul, kuna 16S rRNA 5' ja 3' otste lisanukleotiidid paarduvad omavahel ja selline sekundaarstruktuur takistab edasist biogeneesi (Deutscher, 2009).

1.2.3 rRNA modifikatsioonid

Ribosoomide biogeneesi käigus toimub rRNA standardsete ribonukleotiidide modifitseerimine. Sellised modifikatsioonid on fülogeneetiliselt konserveerunud, mis näitab, et need rRNA modifikatsioonid peavad olema tekkinud valgusünteesi aparaadi varases evolutsioonis. Kaks põhilist rRNA modifikatsioonitüüpi on pseudouridiseerimine ja nukleotiidi lämmastikaluse või

riboosi metüleerimine (Decatur & Fournier, 2002). *E. coli*'s esineb 36 modifitseeritud rRNA nukleosiidi: 16S rRNA sisaldab 11 modifikatsiooni ja 23S rRNA 25 modifikatsiooni (tabel 1). *E. coli* 5S rRNAst ei ole modifitseeritud nukleosiide leitud.

Modifitseerimise viivad läbi modifikatsiooniensüümid, mis peavad ära tundma substraadi(d) ja katalüseerima vastava reaktsiooni. rRNA modifitseerimine ja üleüldine ribosoomi biogenees, koos r-valkude seondumisega on äärmiselt koordineeritud protsess. Kuna assembleerumise käigus satuvad paljud nukleotiidid sügavale ribosoomi struktuuri sisse ja sellega ei ole enam modifikatsiooniensüümidele kätte saadavad, siis esineb reaktsiooni toimumiseks väga väike ajaaken, seega peab olema ensüüm väga kiire. (Winkler, 1998). *In vitro* ja *in vivo* katsete võrdlus näitab, et osad modifikatsiooniensüümid vajavad r-valkude kohalolekut (tabel 1). *In vitro* katsete põhjal on võimalik ennustada rRNA struktuure, mille olemasolu on vajalik, et modifitseerimine saaks toimuda, *in vivo* katsed võimaldavad seõgitada, millises ribosoomi biogeneesi vahepartiklis antud modifikatsioonid sünteesitakse. Bakterites on iga rRNA modifitseeritud nukleosiid modifitseeritud ühe konkreetse modifikatsiooniensüümi poolt, seega peab ensüüm omama nii katalüütilist kui ka substraadi äratundmissaiti vastava substraadi jaoks. Modifikatsiooniensüümid jagatakse kolme klassi: varased, keskmised ja hilised, vastavalt sellele, millises assembleerumise etapis need ensüümid oma modifikatsioonid sünteesivad (Siibak & Remme, 2010).

Tabel 1. Modifitseeritud nukleosiidid *Escherichia Coli* rRNA-s (Ero R., 2012).

| Positsioon | Modifikatsioon | Ensüüm | Ensüümi alternatiivsed nimetused | <i>In vitro</i> substraat | <i>In vivo</i> staadium biogeneesis |
|-----------------|----------------|--------|----------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| 16S rRNA | | | | | |
| 516 | Ψ | RsuA | YejD | pre-30S | varane, keskmine |
| 527 | m7 G | RsmG | GidB | 30S | keskmine |
| 966 | m2 G | RsmD | YhhF | 30S | hiline |
| 967 | m5 C | RsmB | YhdB, Fmu, RrmB | 16S rRNA | varane |
| 1207 | m2 G | RsmC | YjjT | 30S | hiline |

| | | | | | |
|-----------------|--------|----------------|----------------------|-----------|-------------------------|
| 1402 | m4 Cm | RsmH / RsmI | MraW / YraL | 30S | juhuslik |
| 1407 | m5 C | RsmF | YebU | 30S | hiline |
| 1498 | m3 U | RsmE | YggJ | 30S | hiline |
| 1516 | m2 G | RsmJ | YhiQ | 30S | hiline |
| 1518 | m6 2 A | RsmA | KsgA | 30S | hiline |
| 1519 | m6 2 A | RsmA | KsgA | 30S | hiline |
| | | | | | |
| 23S rRNA | | | | | |
| | | | | | |
| 745 | m1 G | RlmA | RrmA, YebH | 23S rRNA | varane |
| 746 | Ψ | RluA | YabO | 23S rRNA | varane |
| 747 | m5 U | RlmC | RumB, YbjF | | varane |
| 955 | Ψ | RluC | YceC | 23S rRNA | varane |
| 1618 | m6 A | RlmF | YbiN | pre-50S | varane, keskmine |
| 1835 | m2 G | RlmG | YgjO | 23S rRNA | varane |
| 1911 | Ψ | RluD | YfiI, SfhB | 50S | hiline |
| 1915 | m3 Ψ | RluD / RlmH | YfiI, SfhB / YbeA | 50S / 70S | hiline / väga hiline |
| 1917 | Ψ | RluD | YfiI, SfhB | 50S | hiline |
| 1939 | m5 U | RlmD | RumA, YgcA | 23S rRNA | keskmine |
| 1962 | m5 C | RlmI | YccW | 23S rRNA | varane |
| 2030 | m6 A | RlmJ | YhiR | 23S rRNA | varane |
| 2069 | m7 G | RlmKL | YcbY | | varane, keskmine |
| 2251 | Gm | RlmB | YjfH | | keskmine |
| 2445 | m2 G | RlmKL | YcbY | 23S rRNA | varane |
| 2449 | D | RldA | | | |
| 2457 | Ψ | RluE | YmfC | 23S rRNA | varane |
| 2498 | Cm | RlmM | YgdE | 23S rRNA | keskmine |
| 2501 | ho 5C | RltA | | | |
| 2503 | m2 A | RlmN | YfgB | | varane |
| 2504 | Ψ | RluC | YceC | 23S rRNA | varane |

| | | | | | |
|------|----|------|---------------------|------------------|--------|
| 2552 | Um | RlmE | RrmJ, FtsJ, MrsF | 50S, 70S | hiline |
| 2580 | Ψ | RluC | YceC | 23S rRNA | varane |
| 2604 | Ψ | RluF | YjbC | 23S rRNA, 50S | varane |
| 2605 | Ψ | RluB | YciL | 23S rRNA | varane |

Vaatamata modifitseeritud nukleosiidide kõrgele konserveerumisele, on leitud, et enamik modifikatsioone ei ole ribosoomi funktsioneerimiseks hädavajalikud, kuid nende deleteerimine vähendab rakkude kohastumust, ehk siis enamik deleteeritud modifikatsioonientsüümidega rakke küll moodustavad funktsionaalseid ribosome ning on võimalised laboritingimustes kasvama metsiktüübiga võrdse kiirusega, kuid sellised rakud ei suuda konkureerida metsiktüüpi ribosoomidega rakkudega (Sergiev et al. 2006; Purta et al. 2008). *In vitro* katsed näitavad, et peptidüültrasferaasreaktsioon, mida katalüüsivad mittemodifitseeritud rRNA-d on ebaefektiivne (Green & Noller, 1999)

1.3 Valgusüntees

Kui ribosoomi subühikute biogenees on edukalt lõpuni jõudnud, saab toimuda subühikute omavaheline assotsatsioon, ja subühikud jäävad teineteisega seotuks kuni valgusünteesi terminatsioonini. Ribosoomi 70S initsiatsioonikompleksis on P-saidis initsiaator tRNA paardunud mRNA initsiaatorkoodoniga ja A-sait on valmis siduma aminoatsüül-tRNA (Steitz, 2008; Wilson & Nierhaus, 2003). Valgusünteesi initsiatsioon toimub mitmes etapis: i) mRNA seondub 30S subühikuga; ii) initsiaator tRNA seondub 30S-mRNA kompleksiga (tekib 30S initsiatsioonikompleks); iii) 50S subühik liitub 30S initsiatsioonikompleksiga. Kirjeldatud protsesse vahendavad valgulised initsiatsioonifaktorid (IF). Prokariootides esineb kolm initsiatsioonifaktorit: IF1, IF2 ja IF3 (Laursen et al., 2005). Translatiooni initsiaatorkoodoniks mRNA järjestusel on AUG.

Prokariootides osalevad translatsiooni elongatsioonis järgmised faktorid: EF-Tu, EF-Ts ja EF-G. Elongatsioonitsüklil algab aminoatsüül-tRNA (aa-tRNA) laadimisega A-saiti, milles osalevad EF-Tu ja GTP. Aa-tRNA paigutatakse A saiti GTP hüdrolyüsi energia arvel ja EF-Tu-GDP kompleks vabaneb ribosoomilt. Peptiidsideme süntees toimub ribosoomi suure subühiku PTC keskuses: P-saidis asuvalt tRNA-lt kantakse kasvav polüpeptiid A-saidis asuvale aminoatsüülrühmale. Järgneb translokatsioon, mille käigus EF-G vahendab GTP energia arvel A- ja P-saitides olevate tRNAde liikumist vastavalt P- ja E-saiti (Wilson & Nierhaus, 2003). Uue aa-tRNA laadimisega A-saiti vabaneb E-saidis olev tRNA ja kirjeldatud

tsükkel kordub kuni mRNA stop koodoni (UAG, UAA või UGA) ilmumisega A-saiti. Terminatsioonifaktorid RF1 ja RF2 tunnevad ühe kolmest stop koodonist ära (RF1 tunneb UAA, UAG ja RF2 tunneb ära UAA, UGA koodonid) (Youngman et al., 2007). Terminatsioonifaktor RF3 kompleksis GTP või GDPga (Pel et al, 1998) katalüüsib RF1 ja RF2 vabanemist ribosoomilt. Pärast translatsiooni terminatsiooni dissotsieerub 70S ribosoomi subühik väiksemaks ja suuremaks subühikuks (Steitz, 2008).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

1 Töö eesmärk

Ribosoomide biogenees on väga keeruline ja täpne protsess, mis algab rRNA primaarse transkripti sünteesi algusega ja lõppeb funktsionaalsete subühikute assotsiatsiooni ja translatsiooni esimese tsükliga. Looduses on üheks esimeseks rRNA protsessimise etapiks rRNA primaarsest transkriptist RNaaasIII lõikus, mille tagajärjel eemaldatakse 16S ja 23S rRNA-de eelasmolekulid rRNA primaarsest transkriptist, et need edasi assambleerida vastavalt funktsionaalseteks 30S ja 50S ribosomaalseteks subühikuteks.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja selgitada, kas alati ühendatud subühikutega ribosoomides (Ribo-T ribosoomides) (Orelle et al., 2015), kus subühikud mitte kunagi lõplikult ei dissotsieeru, esineb samas proportsioonis rRNA modifikatsioone, kui kontrollribosoomides. Püstitati hüpotees, et kuna ribosoomide subühikute biogenees peab ühendatud ribosoomide (Ribo-T) puhul olema teistsugune kui tavapürastes ribosoomides, siis võib eeldada, et ka rRNA modifikatsioonimuster on muutunud.

Hüpoteesi kontrollimiseks analüüsiti kahe sarnase Ribo-T-d sisaldavat *E. coli* tüve rRNA modifikatsioonide mustrit ning võrreldi neid kontrolltüvega.

2 Materjal ja metoodika

2.1 Plasmiidid ja *E. coli* tüved

Eksperimentides on kasutatud *E. coli* tüve SQ171, millelt on deleteeritud kõik kromosomaalsed rRNA geenid. Kontrolltüves on kasutatud pAM55.2 plasmidi, millelt ekspresseeritakse lambda P_L promootori alt rRNA geene *rrnB* operonis. Fast ja Slow tüves ekspresseeritakse pRibo-T plasmidi, mis on pAM55.2 plasmidii derivaat ja sisaldab lambda faagi P_L promootori kontrolli all Ribo-T rRNA geeni, mis konstrueeriti Orelle et al (2015) poolt.

| Tüve nimi | Plasmiid | Viide tüvele käesolevas töös | Genotüüp (kõigil tüvedel) | Allikas (kõigil tüvedel) |
|-----------|----------------|---|--|--|
| SQ171FG | pRibo-T | “Fast” tüvi, sisaldab genoomis spontaanselt tekkinud mutatsioone ribosomi valgu S1 geenis | F-, Δ(<i>rrsH</i> - <i>aspU</i>)794(::FRT), λ-, Δ(<i>rrfG</i> - <i>rrsG</i>)791(::FRT), Δ(<i>rrfF</i> - <i>rrsD</i>)793(::FRT), <i>rph</i> -1, Δ(<i>rrsC</i> - <i>trpT</i>)795(::FRT), Δ(<i>rrsA</i> - <i>rrfA</i>)792(::FRT), Δ(<i>rrsB</i> - <i>rrfB</i>)790(::FRT), Δ(<i>rrsE</i> - <i>rrfE</i>)789(::FRT), <i>ptRNA67</i> , <i>pKK3535</i> | Lahke kink Alexander S. Mankin’ilt (Orelle et al., 2015) |
| SQ171SG | pRibo-T | “Slow” tüvi lisaks Ribo-T-le ei sisalda muutuseid bakteri genoomis | | |
| SQ171 | pAM55.2 | “kontrolltüvi” Sisaldab plasmidilt kodeeritud <i>rrnB</i> operoni | | |

Kiiremakasvulisel Fast ehk SQ171FG ja aelgasema kasvuga Slow ehk SQ171SG tüvel on erinev gerenatsiooniaeg. Fast tüvi sisaldab spontaanselt tekkinud *missense* mutatsiooni *rspA* geenis, mis kodeerib ribosoomi väikse subühiku valku S1, mis kompenseerib rakkude generatsiooniaja defekte (Orelle et al., 2015)

2.2 Söötmed

| Söötme nimi | Koostis | Allikas |
|-----------------------------|---|---------------------------|
| 2xYT vedelsööde | 1,6% trüptoon, 1% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl | Sambrook ja Russell, 2001 |
| Luria-Betani (LB) agarsööde | 1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar | Bertani, 1951 |

Vedelsöötmele lisati vastavalt bateritüve resistentsusmarkerile antibiootikumi ampitsilliin (Amp) lõppkontserntatsioonis 100 µg/ml. LB-Amp tardsöötmele oli lisatud Amp lõppkontsentratsioonis 200 µg/ml.

2.3 Puhvrid, ensüümid ja reagentid

| Nimetus | Koostis |
|----------------------------|--|
| Lüüsipuhver (LP) | 20mM Tris (pH=7,5), 100mM NH ₄ Cl, 10mM MgOAc, 16% (w/v) sahharoos, 6mM β-merkaptotanol |
| Lüüsilahjenduspuhver (LLP) | 20mM Tris, 60mM KCl, 60mM NH ₄ Cl, 12mM MgOAc, 6mM β-merkaptotanol |
| RP-HPLC puhver A | 10 mM NH ₄ H ₂ PO ₄ , 2,5% metanol |
| RP-HPLC puhver B | 10 mM NH ₄ H ₂ PO ₄ , 20% metanol |
| RP-HPLC puhver C | 10 mM NH ₄ H ₂ PO ₄ , 35% atsetonitril |
| TEN puhver | 10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM NaCl |
| TBE puhver | 90 mM Tris-boraat, 2 mM EDTA |

P1 nukleas firmalt Sigma-Aldrich, FastAP termosensitiivne aluseline fosfataas ensüüm firmalt Thermo Fisher Scientific, lütsüüm on firmalt AppliChem, Dnaas I firmalt Amresco, Brij 58 ja DOC firmalt Sigma-Aldrich.

2.4 Ribosoomipartiklite lahutamine ja kogumine

Käesolevas töös tehti neli korduskatset: kahel juhul kasvatati rakud statsionaarsesse faasi ning kahel juhul optilise tiheduseni OD₆₀₀ ≈ 0,8 – 1,0.

E. coli rakud külvati LB-Amp tardsöötmele ning inkubeeriti +37°C juures inkubaatoris kuni kolooniate ilmuniseni. LB-Amp tardsöötmelt inokuleeriti üks koloonia 2 ml 2xYT vedelsöötmesse (Amp lõppkontsentratsioon 100 µg/ml) ning rakke inkubeeriti loksutis +37°C juures (rpm 180) kuni OD₆₀₀ ≈ 0,8. Nendest kultuuridest valmistati 10x lahjendus 20 ml 2xYT vedelsöötmesse (Amp lõppkontsentratsioon 100 µg/ml) ja kasvatati kuni OD₆₀₀ ≈ 0,8. Rakukultuurist tehti uus 20x lahjendus 100 ml-sse 2xYT vedelsöötmesse (Amp lõppkontsentratsioon 100 µg/ml) ning kultuurid kasvatati kas kuni OD₆₀₀ ≈ 0,8 – 1,0 või jäeti rakud kasvama üleöö. Vahelahjenduste käigus oli oluline hoida rakud log-faasis, sest Ribo-T rakkudel on probleeme statsionaarsest faasist uuesti kasvama hakkamisel. Rakud koguti tsentrifuugimise teel 5000 rpm 10 minutit, +4°C juures (tsentrifuug RC-5B, rootor GSA), misjärel sööde eemaldati rakusademelt.

Rakud resuspendeeriti 1 ml-s lüüsipuhvris (LP) ning hoiti 10 minutit jääl koos lüütsüümi (lõppkontsentratsioon 2 mg/ml) ja DNAas I-ga (lõppkontsentratsioon 25 U/ml). Lüüsiefektiivsuse tõstmiseks tehti rakkudele detergendiöötlus (Brij 58 0,5% ja DOC 0,8%) 30 minutit jääl, pärast mida rakud lüüsi mehaaniliselt 0,5 ml klaaskuulidega (diameeter 0,1mm) Precellys 24 homogenisaatoril (3X1 minut 6000 rpm, +4°C). Membraan-kromosomaalne kompleks ning klaaskuulid sadestati Heraeus fresco lauatsentrifuugis 13k rpm 15 minutit. Supernatant eraldati uude tuubi ning lüsaatide nukleiinhappe kogus määrati optilise tiheduse kaudu lainepikkusel 260 nm, kasutades Thermo Fisheri NanoDrop spektrofotomeetrit.

Ribosoomi partiklite lahutamiseks rakulüsaadist kasutati ultratsentrifuugimist läbi sahharoosi gradiendi. Sahharoosi kontsentratsioon gradiendis muutus lineaarselt 15%-30%-ni. Gradientidele kanti 50U LLP-ga lahjendatud rakulüsaati ning ultratsentrifuugiti 17 tundi ja 30 minutit kiirusel 20700 rpm ($\omega^2t = 3,3 \times 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$), temperatuuril +4°C, kasutades Beckman Coulter L-90K ultratsentrifuugi (rootor SW-28). Ribosoomi fraktsioonide visualiseerimiseks ja kogumiseks kasutati GE Healthcare Monitor UVis-920 läbivoolu-spektrofotomeetrit, Pharmacia Biotech peristaatilist pumpa ja LKB Bromma 2210 recorder isekirjutajat. Sahharoosigradientidest koguti ribosoomi fraktsioonid.

Fraktsioneeritud ribosoomide partiklid sadestati 70% lõppkontsentratsiooniga etanoolis -20°C juures 20 minutit ning tsentrifuugimise teel Hettich Rotina 420R tsentrifuugis 4500 rpm 60 minutit, +4°C. Ribosoomisademelt eemaldati supernatant ning ribosoomipartiklid suspendeeridi 400 mikrolitris TEN puhvris.

2.5 Ribosoomaalse RNA puhastamine ja analüüs

Kogutud fraktsioonidest võeti 1 µg ribosoomaalseid partikleid, lisati geelile laadimise puhvrit (lõppkontsentratsioon 1x) ning SDS'i (lõppkontsentratsioon 0,5%) ja segati intensiivselt ning fragmendid lahutati geelelektroforeesiga 1,5% agarosgeelil 150V juures. RNA visualiseeriti puhvris sisalduva etiidiumbromiidiga UV-valguses.

Ribosoomidest rRNA puhastamiseks fenool-kloroformtööluse meetodil võeti 10 U ribosomaalseid partikleid ja lisati valkude denatureerimiseks võrdne maht fenooli (pH 5,0) ja segati intensiivselt. Segu tsentrifuugiti faaside lahutamiseks toatemperatuuril ning vesifaas eraldati uude tuubi. Protsessi korrati kolm korda. Peale viimast fenooltöötlust, lisati vesifaasile võrdne maht kloroformi, et eemaldada lahusest fenool, segati intensiivselt ning faasid lahutati tsentrifugaaljõu toimele. Valguvaba rRNA sadestati 70% lõppkontsentratsiooniga etanoolis 20 minutit -20°C ning tsentrifuugides 13k rpm 20 minutit +4°C. rRNA sade kuivatati +37°C juures 10 minutit ja resuspendeeriti 100 mikrolitris MQ vees. Saadud proovide RNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga A260.

2.5.1 rRNA hüdrolyüs nukleosiidideks

2U rRNA-le, lisati ZnSO₄ (lõppkontsentratsioon 0,6mM), P1 nukleaasi (lõppkontsentratsioon 20 U/ml). Reaktsioonisegu lõppruumala viidi 100 µl-ni ja reaktsioonisegu inkubeeriti 17h, +37°C. P1 hüdrolyüsil tekkinud nukleotiididelt eemaldati fosfaatrühmad FastAP aluselise fosfataasiga 3h +37°C (ensüümi lõppkontsentratsioon 8U/ml, vastavalt tootjapoolstele tingimustele), reaktsioonisegu lõppruumalas 120µl.

rRNA nukleosiidne koostis määrati RP-HPLC analüüsil, mis viidi läbi vastavalt Gehrke ja Kuo poolt esitatud tingimustele (Gehrke & Kuo, 1989). Nukleosiidide lahutamiseks kasutati Supelcosil LC-18-S HPLC kolonni (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) koos eelkolonniga (4.6 mm x 20 mm) 30°C juures masinal SHIMADZU Prominence. Nukleosiidide lahutamiseks kasutati ülalkirjeldatud puhvreid A, B ja C järgmistel tingimustel (Siibak & Remme, 2010):

voolukiirus 1,0 ml/min

- 1) 100% puhver A, 12 minutit
- 2) üleminek 10%-le puhver B-le 8 minutiga
- 3) üleminek 25% puhver B-le 4 minutiga
- 4) üleminek 100% puhver B-le 9 minutiga
- 5) 0%-100% puhver C-le 35 minutiga, hoides 100% puhver C-d 10 minutit
- 6) tasakaalustamine 100% puhver A-ga 30 minutit.

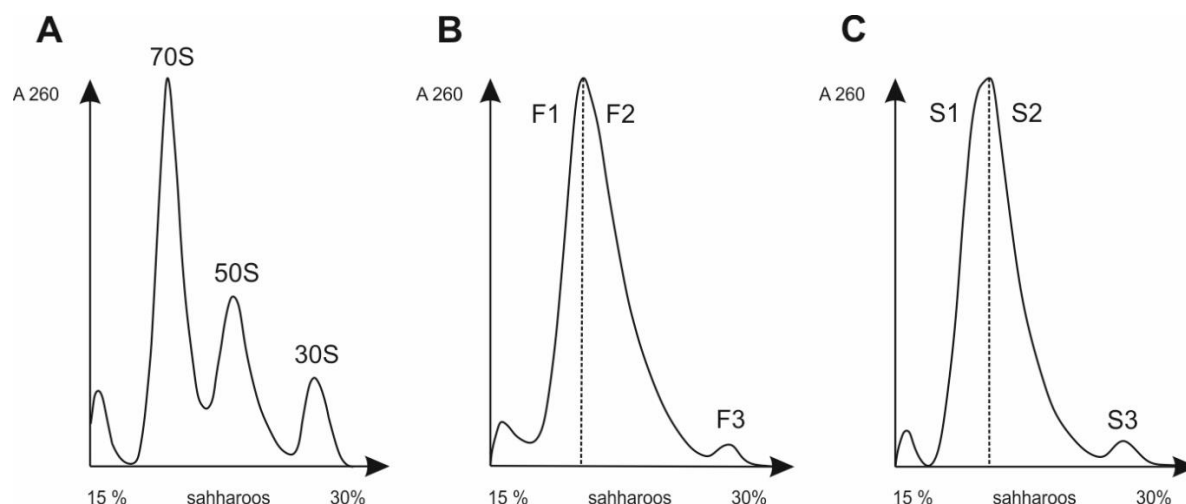
Nukleosiidide optiline neelduvus mõõdeti OD260 ja 280 nm juures ja *peak*'ide pindalad integreeriti arvutiprogrammis Shimadzu LCsolution.

Tulemused normaliseeriti kõikide tüvede standardnukleosiidide järgi kontrolltüve vastu. RiboT modifitseeritud nukleosiidide mustrit võrreldi kontrolltüvede modifikatsioonimustri vastu.

3 Tulemused ja arutelu

3.1 Ribosoomopartiklite lahutamine sahharoosigradiendis

Seotud ribosoomide rRNA-de analüüsimiseks kasutati *E. coli* bakteritüvesid SQ171FG ja SQ171SG milles puuduvad kromosomaalsed rRNA operonid ja milles ekspresseeritakse konstitutiivse P_L promootori alt ühendatud Ribo-T rRNA-d. Kontrollina kasutati samas tüves plasmidi pAM55.2 poolt ekspresseeritud *rrnB* rRNA operoni. Rakke kasvatati, lüüsi ja lüsaadid ultratsentrifuugiti ribosoomide puhastamiseks ning ribosoomiprofiilide analüüsimiseks sahharoosi gradiendis nagu kirjeldatud meetodite osas. Erinevad gradiendifraktsioonid (70S, 50S, 30S või F1/S1, F2/S2, F3/S3) koguti analüüsimiseks nagu näidatud joonisel 5. Ribo-T plasmidi kandvates tüvedes näitavad gradiendiprofiilid selgelt, et rakkudes puuduvad vabad 30S ja 50S ribosomaalsed subühikud (Joonis 5 B ja C), mis on selgelt eriatavad kontrollribosoomide profiilidel (Joonis 5 A). Antud tulemus on heas kooskõlas Orelle et al (2015) kirjeldatud fenotüübiga, kelle andemtel Ribo-T rRNA-d ekspresseerivates rakkudes on ribosoomid alati ühendatud. Kontrolltüves on näha nii 70S ribosoomid, kui ka vabad 50S ja 30S subühikud (joonis 5 A). Samas on gradiendiprofiilides selgelt näha, et võrrelduna kontrolltüve 70S peak'ga, on Ribo-T 70S piigid oluliselt laiemad, mis viitab sellele, et tegemist on ribosoomipartiklite heterogeense populatsiooniga. Selline heterogeensus vihjab, et ribosoomide biogenees ei ole korrektne. Samuti on gradiendis eristatav lisa *peak* piirkonnas, kus kontrollribosoomide puhul asub 30S ribosomaalne partikkel. Võib spekuloida, et Ribo-T ribosoomide vahelist linkeri hüdrolüüsib mõni nukleas, mis eraldab väikese efektiivsusega 50S ja 30S subühikud. Ehkki Ribo-T gradiendiprofiilidelt (joonis 5 B ja C) ei ole võimalik eristada vaba 50S ribosomaalset piiki, ei saa kindlalt väita, et seda ei eksisteeri, kuna piik võib jääda laia heterogeense Ribo-T ribosoomide populatsiooni varju.



Joonis 5. SQ171 bakteritüve ribosoomiprofiilid. 50U rakulüsaati kanti 15%-30% sahharoosi-gradiendile ja tsentrifuugiti 17 tundi ja 30 minutit kiirusel 20700 rpm ($\omega^2 t = 3,3 \times 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$).

A. Kontrolltüve ribosoomipartiklid sahharoosigradiendis, näidatud on 70S, 50S ja 30S fraktsioonid.

B. Fast tüve ribosoomipartiklid sahharoosigradiendis, F1 ja F2 tähistavad Ribo-T 70S ribosome ja on poolitatud punktiirjoonega tinglikult kohast, kust jagati ribosoomide populatsioon analüüsimsse jaoks pooleks. F3 tähistab Ribo-T esprasseerimisel piiki, mis sedimenteerub *wt* 30S subühikute piirkonnas.

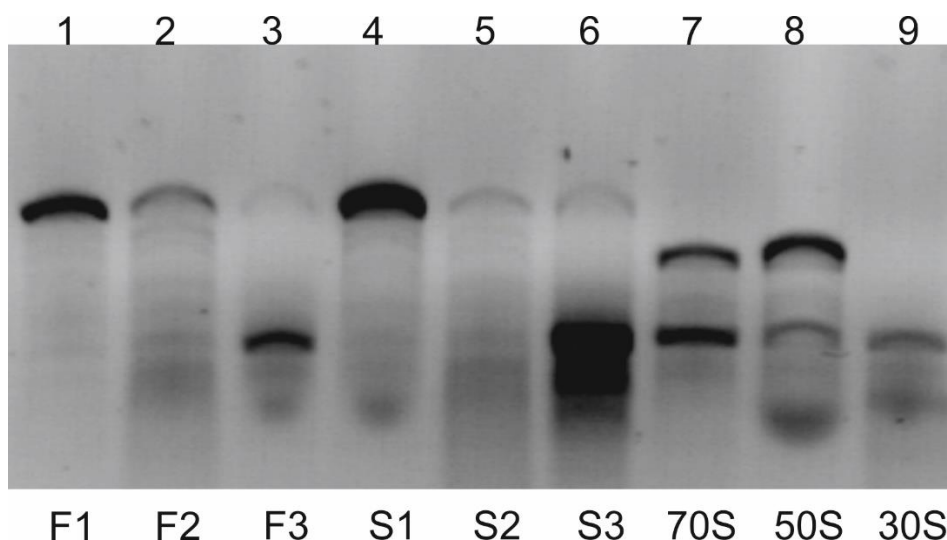
C. Slow tüve ribosoomipartiklid sahharoosigradiendis, S1 ja S2 tähistavad Ribo-T 70S ribosome ja on poolitatud punktiirjoonega tinglikult kohast, kust jagati ribosoomide populatsioon analüüsimsse jaoks pooleks. S3 tähistab Ribo-T esprasseerimisel piiki, mis sedimenteerub *wt* 30S subühikute

3.2 rRNA eraldamine fenool-kloroformtöötlusega ja tulemuste kontroll agarosgeelil

Sahharoosigradiendist koguti erinevad ribosoomipartiklid (joonis 5). Selgitamaks, millise suurusega rRNA-sid sisaldavad erinevad ribosoomi partiklid, lahutati rRNA geelelektroforeesil 1,5% agarosgeelil. Oodatult sisaldab kontroll 70S ribosomaalne partikkel kahte rRNA-d, mis liiguvad vastavalt 23S ja 16S rRNA liikumise piirkonnas (joonis 6, rada 7). Kontroll 30S ja 50S ribosomaalsed partiklid sisaldavad enamuses vastavalt 16S ja 23S rRNA-d (joonis 6, rajad 8 ja 9). Vabade subühikute puhul võib täheldada rRNA lagunemist, millele viitavad rRNA vöödi all olevad hajusad vöödid (joonis 6, rajad 8, 9), mis puuduvad 70S rajal (joonis 6, rada 7).

Ribo-T ribosome sisaldavad Fast ja Slow tüvedest kogutud ribosoomipartiklites esineb tsentrifugaaljõu toimele kaugemale liikunud 70S fraktsioonides (F1 ja S1) suur rRNA vööt, mille suurus viitab sellele, et tegemist on oluliselt pikema rRNA molekuliga, kui tavaline 23S rRNA. Tulemus viitab üheselt, et sahharoosi gradiendi selles piirkonnas on kokkuliidetud 16S-23S rRNA konstruktid (joonis 6 rajad 1 ja 4). Samas Fast ja Slow tüvede 70S väiksema sedimentatsioonikoefitsiendiga fraktsioon (F2 ja S2) sisaldavad rRNA vöödi all hajusaid vöote (joonis 6 rajad 3 ja 5), mis viitavad rRNA lagunemisele. Tüvede Fast ja Slow kolmas fraktsioon, mis asub gradiendiprofiilil kontrolltüve 30S piirkonnas, sisaldab rRNA vöoti kontrolltüve 16S piirkonnas ning hajusaid vöote rRNA vöödi all (joonis 6 rajad 3 ja 6), mis samuti viitab rRNA lagunemisele antud tüvedes.

16S rRNA piirkonnale vastav vöö agaroosgeelil Fast ja Slow tüvede kolmandas fraktsioonis osutab nii nagu ka gradiendiprofiilid, et Ribo-T ribosoomi koos hoidvat linkerit hüdrolüüsitakse mõne nukleaasi poolt. Hajusad vöödid Fast ja Slow tüvede teises ning kolmandas (F2/S2 ja F3/S3) fraktsioonis viitavad rRNA lagproduktidele, mis võib olla tingitud sellest, et kuna rRNA geenid on konstitutiivse promootori kontrolli all ja rRNA süntees toimub kogu aeg ning seetõttu ei assambleeru kõik rRNA-d lõpuni valmis ribosoomi partikliteks, vaid lagundatakse nukleaaside poolt.



Joonis 6. rRNA molekulide lahutamine 1,5% agaroosgeelis. Üleval on näidatud radade numbrid. All vasakult paremale on näidatud Fast tüve kolm fraktsiooni (F1-F3), siis Slow tüve kolm fraktsiooni (S1-S3) ning seejärel kontrolltüve kolm fraktsiooni (70S, 50S ja 30S).

3.3 Modifitseeritud nukleosiidide detekteerimine RP-HPLC analüüsil

Ribo-T plasmiidilt transkribeeritava alati ühendatud rRNA modifikatsioonimustri võrdlemiseks kontroll rRNA modifikatsioonimustriga kasutati RP-HPLC analüüsi nagu on kirjeldatud meetodites.

Statsionaarse ja eksponensiaalse kasvufaasi rakkudest puhastatud rRNA-sid analüüsiti eraldi. Samuti analüüsiti eraldi heterogeenset Ribo-T 70S populatsiooni, et tuvastada, kas erinevate partiklite modifikatsioonimuster on erinev.

Modifikatsioonide võrdlus Fast ja Slow tüvede ja kontrolltüve vahel: (joonised 7-10)

Pseudouridiini (Ψ) suhe kahe võrreldud tüvede vahel ei ole märkimisväärselt muutunud üheski katses, veapiirides võib olla tingitud sellest, et Ψ on levinuim rRNA modifikatsioon ning nende arv ei ole kõikides rakkudes ühesugune.

m5C esinemissageduse erinevus võrreldes kontrolltüvega on logaritmilises faasis Fast ja Slow tüve puhul samasugune. Esimeses kogutud fraktsioonis on m5C-d veidi vähem kui kontrolltüves, kuid teises fraktsioonis on m5C esinemine vähenenud kolmandiku võrra võrreldes kontrolltüvega. Statsionaarses faasis on Slow tüve puhul esinemissagedus sarnane log faasiga, kuid Fast tüves on modifikatsioone mõlemas fraktsioonis rohkem.

Cm puhul on mõlemas kasvufaasis kõikide tüvede esimene fraktsioon võrreldav kontrolltüvega, ehk modifikatsioonid pole vähenenud, kui teised fraktsioonid sisaldavad antud modifikatsiooni umbes 20% vähem kontrolltüvest, välja arvatud Fast tüvi statsionaarses faasis.

m7G esineb statsionaarses faasis mõlema tüve puhul samas mahus, mis kontrolltüves, kuid logaritmilises faasis esimene fraktsioon on küll kontrolltüvega samas mahus, kui teises fraktsioonis esineb antud modifikatsiooni umbes 10% vähem Fast tüves ja 20% vähem Slow tüves.

m5U esinemine on veidi vähenenud mõlemas kasvufaasis Fast ja Slow tüvedes, veapiire arvestades enam vähem sams mahus mõlemas fraktsioonis, suunaga vähenemise poole teises fraktsioonis.

Um esinemine on Fast ja Slow tüvedes erinev sõltuvalt tüvest ja kasvufaasist. Kõikide tüvede kõikides kasvufaasides on esimene fraktsioon veidi vähenenud võrreldes kontrolltüvega välja arvatud Slow tüves statsionaarses faasis, kus modifikatsiooni esinemine on vähenenud poole võrra. Kõikide tüvede kõikides kasvufaasides on teises fraktsioonis esinevad modifikatsioonid umbes poole võrra vähenenud võrreldes esimese fraktsiooniga. Antud modifikatsiooni vähenemist saab seletada sellega, et Um on 70S ribosoomi hiline modifikatsioon (tabel 1) ja kuna Ribo-T ribosoomi biogenees kulgeb ilmselt alternatiivset rada pidi, siis ei ole ka antud modifikatsioonide esinemine võrreldav kontrolltüvega.

m3U modifikatsiooni esinemine on väga erinev sõltuvalt kasvufaasist. Logaritmilises faasis on nii Fast kui ka Slow tüve esimeses fraktsioonis modifikatsioon vähenenud umbes kolmandiku võrra võrreldes kontrolltüvega, kuid teises fraktsioonis on Fast tüves vähem kõnealust modifikatsiooni kui Slow tüve teises fraktsioonis. Teistsugune pilt on statsionaarses faasis, kus Fast tüve esimene fraktsioon on võrreldav kontrolltüvega ning teises fraktsioonis on modifikatsioone kolmandiku võrra vähem, kuid Slow tüve teine peak on poole võrra suurem kui kontrolltüves ning see tulemus kordub mõlemas katses. Slow tüve esimene fraktsioon statsionaarses faasis on võrreldav kontrolltüvega. m3U on ribosoomi väikese subühiku hiline modifikatsioon (tabel 1).

m4Cm esinemissagedus statsionaarses faasis on veapiire arvesse võttes sarnane kontrolltüvega, kuid logaritmilises faasis on kõnealune modifikatsioon esindatud poole

vähem. Seda võib seletada antud modifikatsiooni esinemisega Ribo-T linkeri piirkonnas 16S rRNA heeliks 44 juures (Lisa 2), mis näitab, et kasvufaasis on antud modifikatsiooni tegemine raskendatud, hiljem modifikatsioonimuster taastub.

Gm ja m1G paistavad olevat modifikatsioonid, mis ei sõltu erinevatest tüvedest ega kasvufaasidest. Modifikatsiooni kõrgem esinemine kontrolltüve suhtes võib olla tingitud sellest, et antud modifikatsioone ei tehta 100% kontrolltüves.

m2G esinemine on enam vähem sarnane kõikides tüvedes kõikides kasvufaasides, olles veidi vähenenud rohkem log faasis ning teisena kogutud fraktsioonides. Logaritmilises faasis esinev modifikatsioonide vähenemine võib olla tingitud sellest, et m2G asub Ribo-T linkeri piirkonnas 16S rRNA 3' otsa lähedal (Lisa 2.) ning logaritmilises faasis ei pruugi vastav äratundmissait olla modifikatsiooniensüümile kättesaadav. Statsionaarses faasis modifikatsioonimuster taastub.

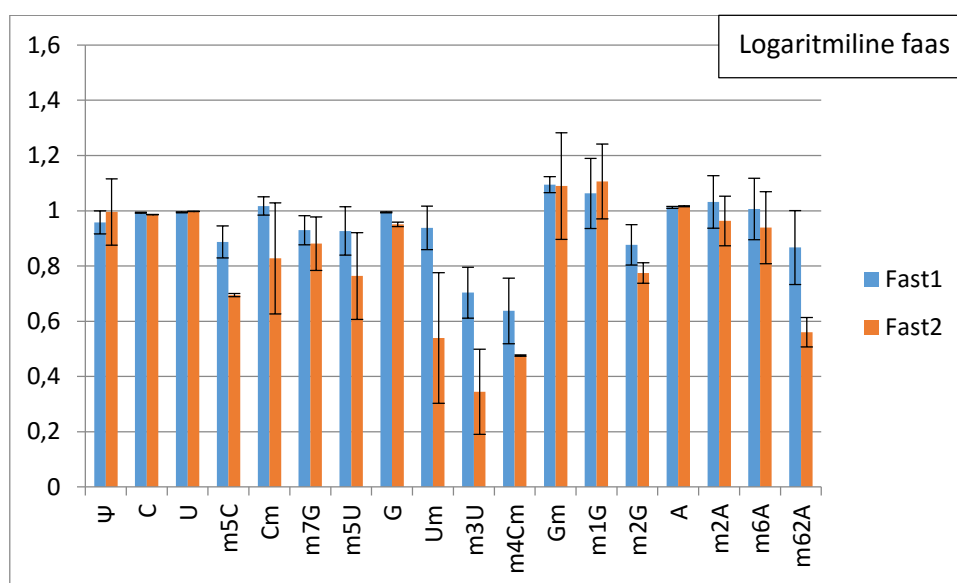
m2A puhul on näha, et Fast tüvi ei erine kontrolltüvest, kuid Slow tüve puhul statsionaarses faasis esimeses fraktsioonis modifikatsioone umbes 20% vähem ja teises fraktsioonis umbes 50% vähem, samas kui logaritmilises faasis on modifikatsioonide esinemine erinevates fraktsioonides vastavalt umbes 10% ja 20% vähem.

m6A paistab olevat modifikatsioon, mis ei sõltu erinevatest tüvedest ega kasvufaasidest. Modifikatsiooni kõrgem esinemine kontrolltüve suhtes võib olla tingitud sellest, et antud modifikatsiooni ei tehta 100% kontrolltüves.

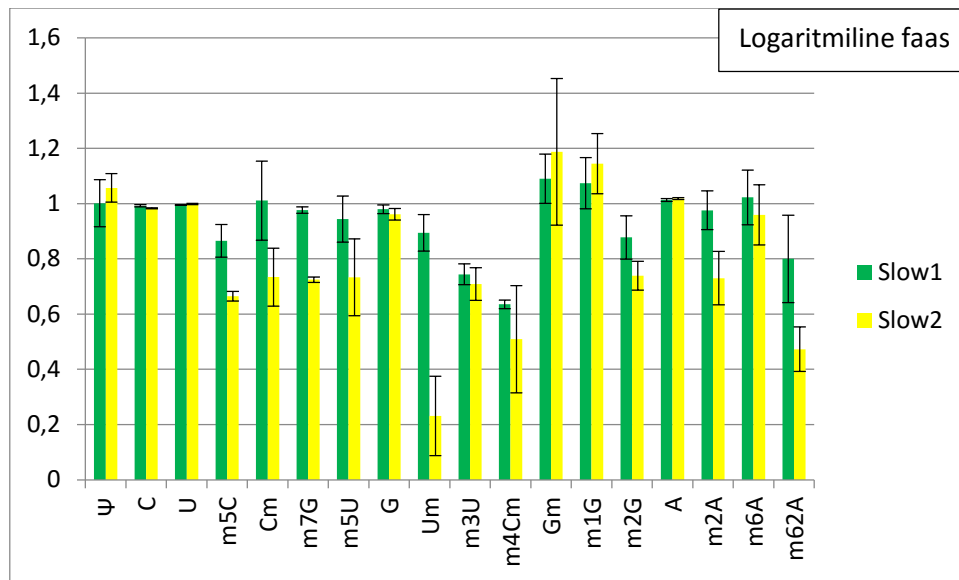
m62A esineb logaritmilises faasis Fast tüve esimes fraktsioonis veidi vähem kui kontrolltüves ja teises fraktsioonis umbes poole võrra vähem kui kontrolltüves. Statsionaarses faasis esineb Fast tüve esimene fraktsioon võrreldavana kontrolltüvega ja teine fraktsioonis on modifikatsioon vähenenud umbes 20%. Slow tüve puhul on esinev modifikatsioon mõlemas kasvufaasis esimeses fraktsioonis veidi vähenenud võrreldes kontrolltüvega ja teises fraktsioonis on antud modifikatsiooni umbes poole vähem kui kontrolltüves. Kõnealuse modifikatsiooni taseme langus võib olla tingitud selles, et m62A asub Ribo-T linkeri piirkonnas 16S rRNA 3' otsa läheduses (Lisa 2) ning vastav äratundmissait ei pruugi olla modifikatsiooniensüümile nii hästi kättesaadav kui kontrolltüves. Samuti on m62A ribosoomi väikese subühiku hiline modifikatsioon (tabel 1), mis viitab sellele, et ribosoomi biogeneesi kulgeb alternatiivset rada pidi ja antud modifikatsioone ei tehta nii palju kui kontrolltüves.

Joonistelt 7-10 on näha, et Fast ja Slow tüvede modifikatsioonimuster erineb kontrolltüve rakkudest. Lähtudes käesoleva töö kirjanduse ülevaates toodud tabelist 1, siis on eelkõige vähenenud ribosoomi subühikute biogeneesi hiliselt esinevad modifikatsioonid ning need modifikatsioonid, mis jäävad Ribo-T konstrukti 23S rRNA osa "taha" (lisa 1, lisa 2). Kuna ka

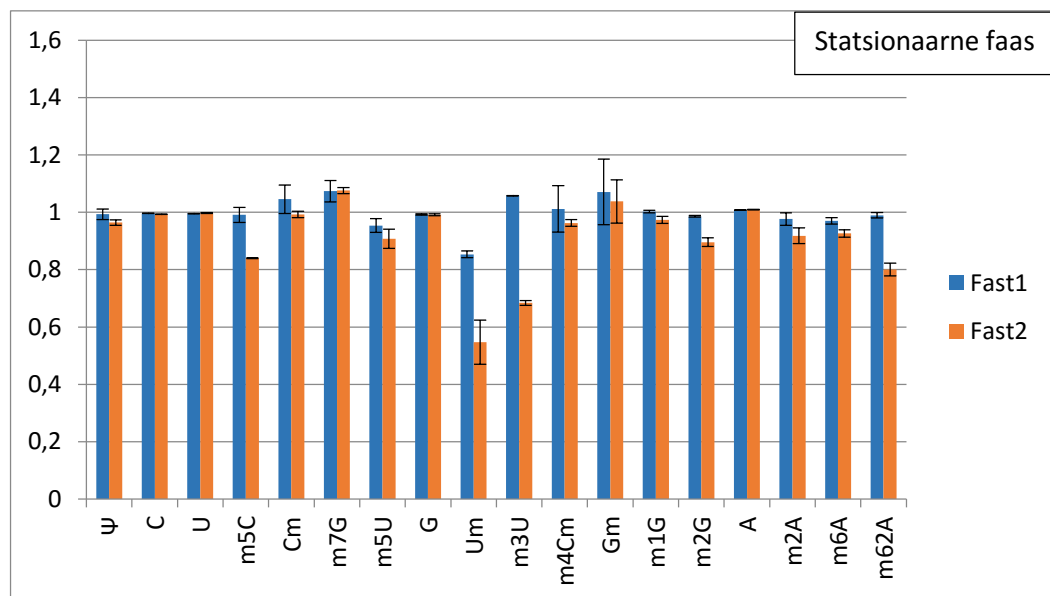
kirjanduses on näidatud, et kõik normaalsetes ribosoomides esinevad modifikatsioonid ei ole hädavajalikud *E. Coli* ribosoomide funktsioneerimiseks, siis käesolev töö kinnitab esialgsetele tulemustele tugenedes, et vähenenud rRNA modifikatsioonide puhul on rakud eluvõimelised. Käesolevas töös analüüsitud tüvedel, mille rRNA modifikatsioonimuster erineb normaalsete ribosoomide rRNA-st on väga tugev kasvudefekt, eriti raske on kõnealuste tüvede väljatulek statsionaarsest faasist uude logaritmilisse faasi ning see ei saa olla tingitud rRNA modifikatsioonide muutusest. Võib oletada, et Ribo-T ribosoomide puhul on mingi ribosoomi biogeneesi etapp oluliselt häiritud ja sellele jälile saamiseks võime otsida vihjeid rRNA modifikatsioonimustri muutusest.



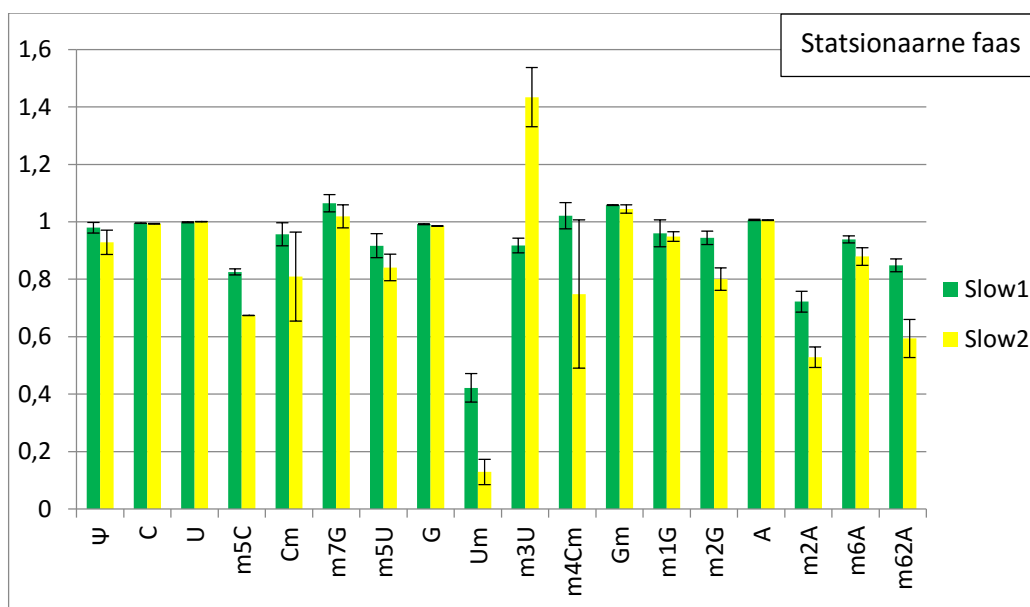
Joonis 7. Fast tüve modifikatsioonimuster logaritmilises kasvufaasis. Siniste tulpadena on näidatud Ribo-T “Fast” tüve esimese *peak*’i modifikatsioonide suhe võrrelduna kontrolltüvega, oranžiga vastavalt sama tüve teise *peak*’i modifikatsioonid. Musta vertikaaljoonega on toodud kahe katseparalleeli veapiirid.



Joonis 8. Slow tüve modifikatsioonimuster logaritmilises kasvufaasis. Roheliste tulpadena on näidatud Ribo-T “Slow” tüve esimese *peak*’i modifikatsioonide suhe võrrelduna kontrolltüvega, punasega vastavalt sama tüve teise *peak*’i modifikatsioonid. Musta vertikaaljoonega on toodud kahe katseparalleeli veapiirid.



Joonis 9. Fast tüve modifikatsioonimuster statsionaarses kasvufaasis. Siniste tulpadena on näidatud Ribo-T “Fast” tüve esimese *peak*’i modifikatsioonide suhe võrrelduna kontrolltüvega, oranžiga vastavalt sama tüve teise *peak*’i modifikatsioonid. Musta vertikaaljoonega on toodud kahe katseparalleeli veapiirid.



Joonis 10. Slow tüve modifikatsioonimuster statsionaarses kasvufaasis. Siniste tulpadena on näidatud Ribo-T “Slow” tüve esimese *peak*’i modifikatsioonide suhe võrrelduna kontrolltüvega, oranžiga vastavalt sama tüve teise *peak*’i modifikatsioonid. Musta vertikaaljoonega on toodud kahe katseparalleeli veapiirid.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas Ribo-T ribosoomides esineb samas proportsioonis rRNA modifikatsioone kui kontrollribosoomides.

Modifikatsioonimuster Ribo-T ribosoomides erineb kontrolltüvest, kusjuures vähenenud on modifikatsioonid, mis on varasemalt kirjanduses näidatud esinevat ribosoomi biogeneesi hilises osas eraldatud partiklites.

Käesoleva töö raames kogutud tulemuste põhjal võib järeldada, et Ribo-T ribosoomides on puudu mitmed modifikatsioonid, mis jäävad 16S rRNA piirkonda, millesse tehti muudatused, kui loodi seotud ribosoomi rRNA konstrukt. See viitab asjaolule, et ribosoomi ühendamise piirkonnas on piisavalt suured muutused ribosoomi struktuuris, et modifikatsiooniensüümid ei ole võimelised modifikatsioone sünteesima.. Samuti on rRNA-dest puudu mõned hilised modifikatsioonid. Hiliste modifikatsioonide puudumise põhjusena võib spekulatsioonida, et Ribo-T ribosoomide biogenees ei jõua sellisesse faasi, kus viimased modifikatsioonid sünteesitakse. Modifikatsioonide puudumine võib olla põhjustatud sellest, et niimoodi kokku pandud rRNA, ei oma korrektset äratundmissaiti, mida tunneks ära modifikatsiooni eest vastutav ensüüm.

Normaalsest erineva modifikatsioonimustri analüüs saab tulevikus anda vihjeid selle kohta, mismoodi selliste ribosoomide biogenees võiks toimuda ja mis on tegelikud takistused normaalse fenotüübi saavutamisel.

rRNA modifications in ribosomes with tethered subunits in *Escherichia coli* cells

Ermo Leuska

SUMMARY

Ribosome is ribonucleoprotein complex that is responsible for translation in all organisms across the different domains on life. *Escherichia coli* is one of the most common organisms for studying ribosomes and protein synthesis. Ribosomes translate the information encoded in mRNA nucleotide sequence into amino acid sequence of proteins. In all organisms found so far, the functional ribosome consists of two unequal subunits, which have different functions in protein translation (Tissieres & Watson 1958). Small ribosomal subunit is responsible for mRNA decoding and large subunit is responsible for catalysis of peptide bond. Subunits are formed of ribosomal RNA (rRNA) and ribosomal proteins (r-proteins), while RNA forms the peptidyl transferase center making ribosome the ribozyme.

rRNA structure and modifications are very conserved in different organisms, although most of the modifications are not essential for ribosome functioning (Sergiev et al. 2006; Purta et al. 2008b). Modification can be divided into three groups based on their time of occurrence *in vivo*: early, intermediate and late modifications (Siibak & Remme 2010).

Recently, a ribosome with tethered subunits was constructed by Orelle et al (2015). In this ribosome (called Ribo-T), the subunits never dissociate after the translation termination, but the cells carrying Ribo-T ribosomes are viable although the cell generation times are prolonged.

Aim of this thesis was to compare the rRNA modification pattern in ribosomes with tethered subunits to the control ribosomes. In the experimental part of the thesis we analyzed three different *E. coli* strains, one control strain and two strains with Ribo-T ribosomes exhibiting slightly different generation times.

Differences in ribosomal gradient profiles, gel-electrophoresis and RP-HPLC analysis revealed that the modification pattern in Ribo-T ribosomes compared to control ribosomes were different. Several modifications were underrepresented in Ribo-T rRNA. The underrepresented modifications were either located near Ribo-T linker area or the modifications are known to be late in ribosome biogenesis. The information shows that the modification enzymes that carry out these modifications can't access their substrates because due to the different conformation of rRNA.

TÄNUSÕNAD

Autor tänab molekulaarbioloogia ja biokeemia labori sõbralikku ja abivalmit seltskonda. Eriline tänu kuulub minu praegusele juhendajale Margus Leppikule erakordse kannatlikkuse ja tehnilise taiplikkuse eest, professor Jaanus Remmele soojust ja tarkust kiirgava olemasolu eest ja minu varasematele juhendajatele Rya Erole ja Aivar Liivile, kellele võlgnen tänu molekulaarbioloogia imelise maailmapildi algtõdede tundmaõppimise eest.

Ben-Shem A., Garreau de Loubresse N., Melnikov S., Jenner L., Yusupova G. & Bram R. J., Young R. A. & Steitz J. A. (1980). The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of *E. coli*. *Cell* 19, 393–401.

Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Carter A. P., Wimberly B. T. & Ramakrishnan V. (2002). Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA. *Journal of Molecular Biology* 316, 725–768.

Decatur, W., and Fournier, M. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in biochemical sciences*, 27(7), 344–351. doi: 10.1016/S0968-0004(02)02109-6

Deutscher M. P. (2009). Maturation and degradation of ribosomal RNA in bacteria. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 85, 369–391.

Frank, J., Agrawal, R.K. (2000). A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406, 318–322.

Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S., van Roey, P., Agrawal, R. K., Harvey, S. C., Sali, A., Chapman, M. S., Frank, J. (2003). Study of the Structural Dynamics of the *E. coli* 70S Ribosome Using Real-Space Refinement. *Cell*. 113: 789–801.

Gehrke C, Kuo K. (1989). Ribonucleoside analysis by reversed-phase highperformance

Green R, Noller HF (1999). In vitro complementation analysis localizes 23S rRNA posttranscriptional modifications that are required for *Escherichia coli* 50S ribosomal subunit assembly and function. *RNA*. 1999;2:1011–1021.

Hardy S. J. (1975). The stoichiometry of the ribosomal proteins of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 140, 253–274.

Kaczanowska M. & Ryden-Aulin M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 477–494.

Kitahara K. & Suzuki T. (2009). The ordered transcription of RNA domains is not essential for ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Molecular Cell* 34, 760–766.

Laursen BS, Sørensen HP, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU.(2005) Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005 Mar;69(1):101-23.

liquid chromatography. *J Chromatogr* 471: 3–36.

Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural and molecular biology*, 19(6), 560-567. doi: 10.1038/nsmb.2313

Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2003). The structural basis on the large ribosomal subunit function. *Annual review of biochemistry* 72: 813-850.

Noller, H. F ja Woese C. R (1981). Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science*. Vol. 212 no. 4493 pp. 403-411. DOI: 10.1126/science.6163215

Noller, H.F., Kop, J., Wheaton, V., Brosius, J., Gutell, R.R., Kopylov, A.M., Dohme, F., Herr, W., Stahl, D.A., Gupta, R. and Woese, C.R. (1981). Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 6167-6189.

Pel Herman J., Moffat John G., Ito Koichi, Nakamura Yoshikazu, Tate Warren P. (1998) Escherichia coli release factor 3: Resolving the paradox of a typical G protein structure and atypical function with guanine nucleotides. *RNA* 1998 4: 47-54

Purta E., O'Connor M., Bujnicki J.M. & Douthwaite S. (2008). YccW is the m5C methyltransferase specific for 23S rRNA nucleotide 1962. *Journal of molecular biology*, 383, 641–51.

Rodnina, M. V., Beringer, M., Wintermeyer, W. (2006). How ribosomes make peptide bonds. *Trends in Biochemical Sciences* 32: 20-26.

Schlueder F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F. & Yonath A. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* 102, 615–623. *Science* 334, 1524–1529.

Selmer M., Dunham C. M., Murphy F. V. t., Weixlbaumer A., Petry S., Kelley A. C., Weir J. R. & Ramakrishnan V. (2006). Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313, 1935–1942.

Sergiev P.V., Lesnyak D.V., Bogdanov A.A. & Dontsova O.A. (2006). Identification of Escherichia coli m2G methyltransferases: II. The ygjO gene encodes a methyltransferase specific for G1835 of the 23 S rRNA. *Journal of molecular biology*, 364, 26–31.

- Shine, J., Dalgarno, L.** (1974) The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71: 1342-1346.
- Siibak T. & Remme J.** (2010). Subribosomal particle analysis reveals the stages of bacterial ribosome assembly at which rRNA nucleotides are modified. *RNA* 16, 2023–2032.
- Steitz T. A.** (2008). A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nature Reviews* 9, 242–253.
- Tissieres A. & Watson J. D.** (1958). Ribonucleoprotein particles from Escherichia coli. *Nature* 182, 778–780.
- Wang K. T., Desmolaize B., Nan J., Zhang X. W., Li L. F., Douthwaite S. & Su X. D.** (2012). Structure of the bifunctional methyltransferase YcbY (RlmKL) that adds the m7G2069 and m2G2445 modifications in Escherichia coli 23S rRNA. *Nucleic Acids Research.*
- Wilson D. N. & Nierhaus K. H.** (2007). The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 42, 187–219.
- Wilson, D. and Nierhaus, K.** (2005). Ribosomal proteins in the spotlight. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 40(5), 243-267. doi: 10.1080/10409230500256523
- Wilson, D.N., Blaha, G., Connell, S. R., Ivanov, P. V., Jenke, H., Stelzl, U., Teraoka, Y., Nierhaus, K. H.** (2002). Protein synthesis at atomic resolution: mechanistics of translation in the light of highly resolved structures for the ribosome. *Current Protein and Peptide Science* 3: 1-53.
- Wilson, D.N., Nierhaus, K.H.** (2003). The ribosome through the looking glass. *Angewandte Chemie (International Ed)* 42: 3464-3486.
- Wimberly, B., Brodersen, D., Clemons, W., Morgan-Warren, R., Carter, A., Vonnrhein, C., Hartsch, T., Ramakrishnan, V.** (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407(6802), 327-339. doi: 10.1038/35030006
- Winkler M. E.** (1998). Genetics and Regulation of Base Modifications in the tRNA and rRNA of Prokaryotes and Eukaryotes. *Modification and Editing of RNA*. Edited by Henri Grosjean and Rob Benne.

Youngman EM, He SL, Nikstad LJ, Green R. (2007) Stop codon recognition by release factors induces structural rearrangement of the ribosomal decoding center that is productive for peptide release. *Mol Cell*. 2007 Nov 30;28(4):533-43.

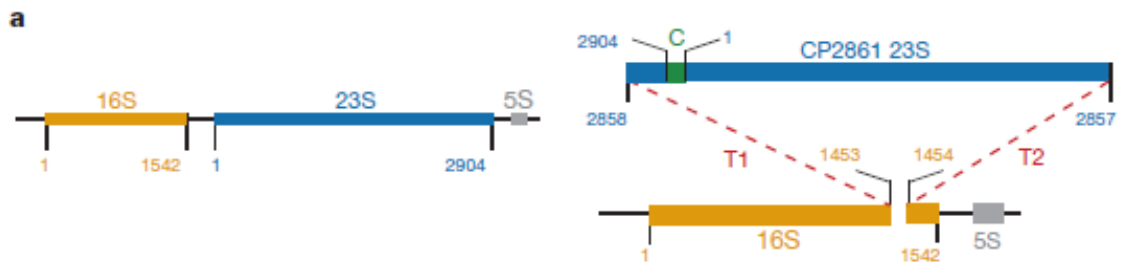
Yusupov M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution.

Yusupov M. M., Yusupova G. Z., Baucom A., Lieberman K., Earnest T. N., Cate J. H. & Noller H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292, 883–896.

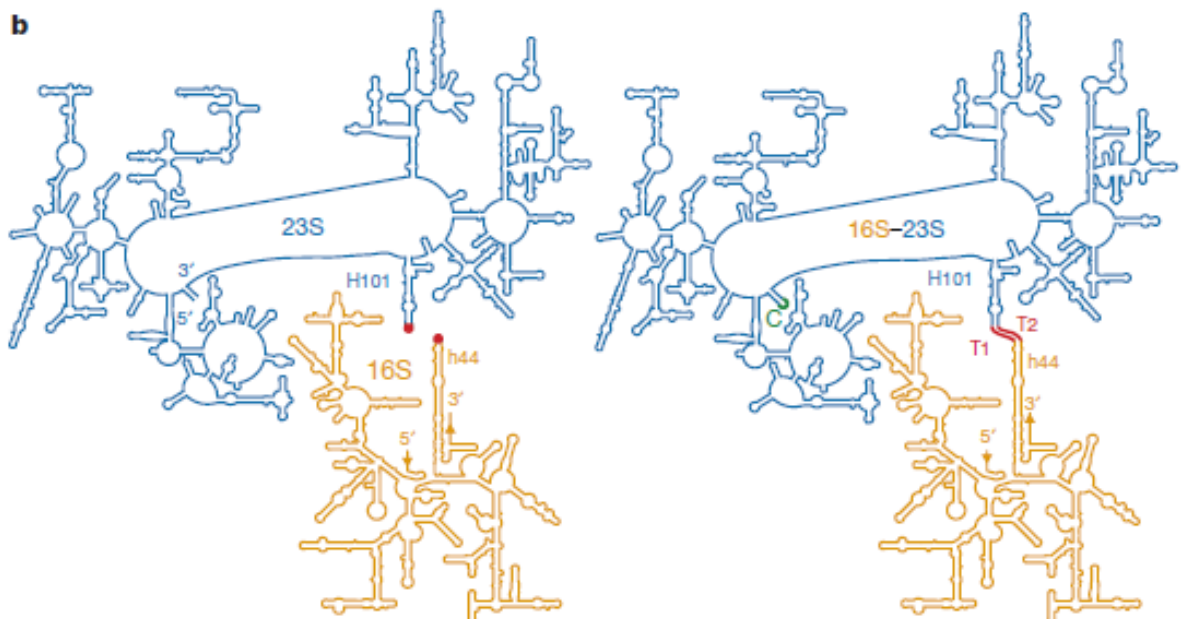
[Raamatud:](#)

Ero R., (2012) Modifier view of the bacterial ribosome, Tartu Ülikooli Kirjastus

a. Lineaarne pre-rRNA mudel: vasakul on näidatud metsiktüüpi pre-rRNA ja paremal ribo-T konstrukt, kus 23S rRNA on pandud 16S vahele.

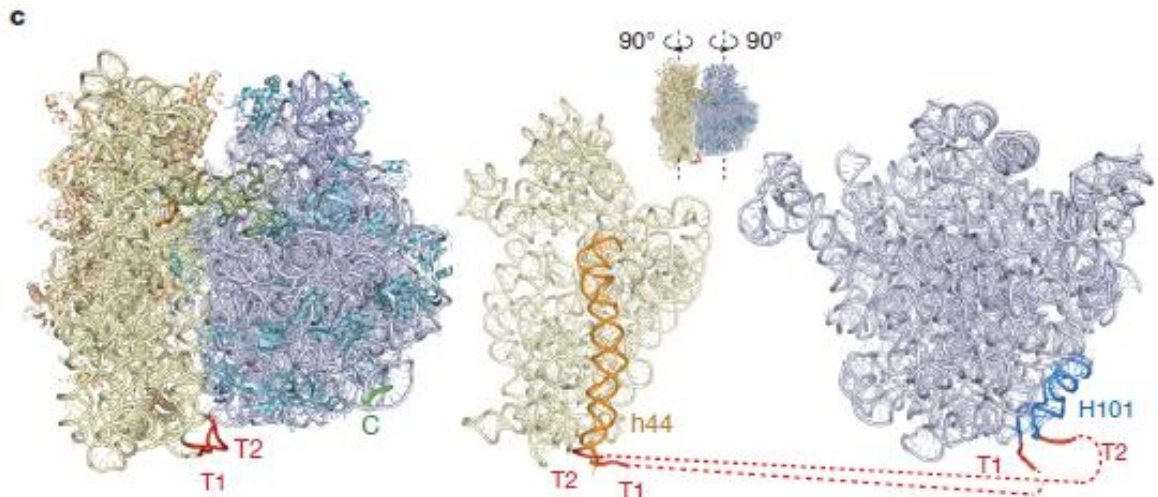


b. *E. coli* rRNA sekundaarstruktuuri mudel: vasakul on näidatud vabalt esinevate 16S ja 23S rRNA molekulide sekundaarstruktuur, paremal ribo-T konstrukt, kus rRNA on RNA-RNA sillaga alaliselt ühendatud 16S rRNA heeliks 44 ja 23S rRNA heeliks101 kaudu.



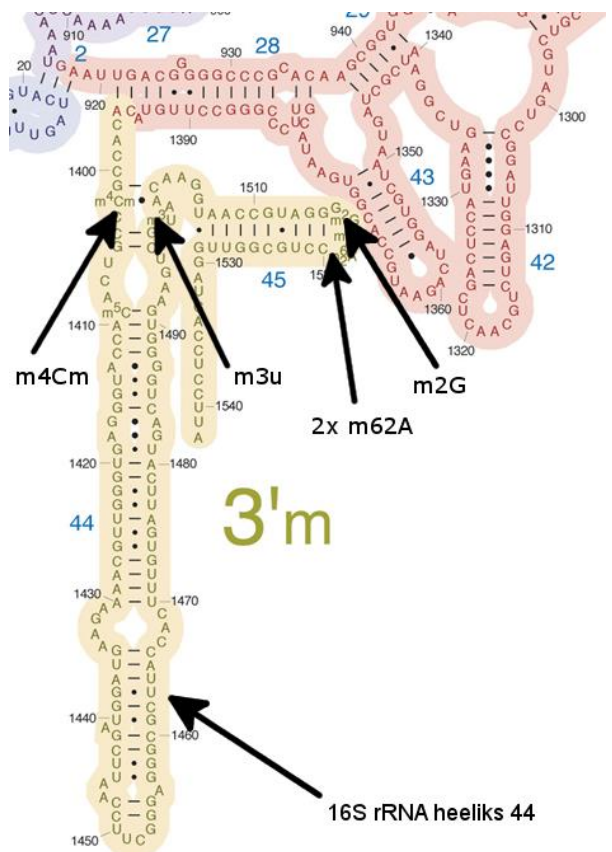
c. vasakul: 3D ribo-T mudel: 16S rRNA kollane, 30S valgud oranž, 23S rRNA sinine, 50S valgud (cyan), tRNA P-saidis (oliiv), mRNA (oranž), konnektor 23S 5' ja 3' otste vahel (roheline), linkerid T1 ja T2 (punane)

paremal: ribo-T avatud kui raamat, ribosoomi valgud ei ole näidatud, 16S rRNA heeliks 44 (oranž), 23S rRNA heeliks 101 (sinine), linkerid T1 ja T2 (punane)



Lisa 2

16S rRNA piirkond, kuhu kinnitub Ribo-T puhul 23S rRNA (1453-1454 nt vahele) ja selle läheduses esinevad modifitseeritud nukleosiidid.



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.

Mina, Ermo Leuska

(sünnikuupäev: 17.08.1983)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**rRNA modifikatsioonid Ribo-T ribosoomides Escherichia Coli rakkudes**“, mille juhendaja on Margus Leppik, PhD,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-i lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016.